

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Žaneta Naimová**

Účinky sulfatovaných neurosteroidů na proteiny účastníci se excitačního synaptického přenosu

Effects of sulfated neurosteroids on proteins involved in excitatory synaptic transmission

Bakalářská práce

Školitel: Tereza Smejkalová, Ph.D.

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. 5. 2017

Podpis

### **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat své školitelce Tereze Smejkalové, Ph.D. za cenné rady a trpělivost při tvorbě této práce. Také bych ráda poděkovala kolegům z oddělení Buněčné neurofyzilogie Fyziologického ústavu AV ČR, v. v. i. za vytváření příjemného pracovního kolektivu. A nakonec bych chtěla poděkovat svému partnerovi, rodině a přátelům za jejich podporu.

## **Abstrakt**

Objev steroidních látek, které jsou schopny se v CNS a PNS syntetizovat anebo akumulovat, vedl z otázky, jakou zde mají funkci. Neurosteroidní látky mají schopnost modulovat synaptický přenos. Působení je rychlé a přímé, zprostředkované skrze nengenomické mechanismy. Účinek těchto látek je znám na celou řadu kanálů a receptorů – excitačních i inhibičních. Tato práce shrnuje poznatky o působení sulfatovaných neurosteroidů na proteiny účastnících se excitačního synaptického přenosu. V práci jsou zahrnuty poznatky o působení na ionotropní glutamátové receptory, TRP kanály, metabotropní receptory, sodné a draselné kanály. Nadměrná nebo nedostatečná aktivita těchto proteinů zapojených do synaptického přenosu může vést k patologickým stavům. Cílem této práce je shrnout poznatky o působení těchto látek, poukázat na strukturní a funkční charakteristiky pravděpodobně zodpovědných za jejich účinek a zároveň nastínit jejich možné farmakologické užití.

**Klíčová slova:** neurosteroidy, NMDA receptor, synaptický přenos, pregnanolon sulfát

## **Abstract**

The discovery of steroid compounds capable of synthesise or accumulation in CNS and PNS led to a question about their function. Neurosteroid compounds are capable of modulating synaptic transmission. Effect is direct and fast mediated through nongenomic mechanisms. They are known to affect wide array of channels and receptors - both excitatory and inhibitory. This thesis summarizes findings about effect of sulfated neurosteroid on proteins involved in excitatory synaptic transmission. Thesis covers findings about ionotropic glutamate receptors, TRP channels, metabotropic receptors, sodium and potassium channels. Excessive or insufficient activity of these proteins involved in synaptic transmission can lead to a pathological condition. The purpose of this thesis is to summarize findings about effect of these compounds, point out structural and function characteristic probably responsible for their action and to outline possible pharmacological usage.

**Key words:** neurosteroids, NMDA receptor, synaptic transmission, pregnanolone sulfate

## Seznam použitých zkratk

**3 $\alpha$ 5 $\alpha$ S** 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on sulfát (3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on sulfate)

**3 $\alpha$ 5 $\beta$ S** 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfate)

**3 $\beta$ 5 $\alpha$ S** 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on sulfát (3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on sulfate)

**AMPA**  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina

**AMPA** receptor  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové kyseliny ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionic acid receptor)

**ATD** amino-terminální doména (amino-terminal domain)

**CNS** centrální nervová soustava (central nervous system)

**DHEA** dehydroepiandrosteron (dehydroepiandrosterone)

**DHEA-S** dehydroepiandrosteron sulfát (dehydroepiandrosterone sulfate)

**DNA** deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

**Epipregnas** epipregnanolon sulfát (epipregnanolone sulfate)

**EPSC** excitační postsynaptický proud (excitatory postsynaptic current)

**ERK** extracelulárně signálem-regulovaná kináza (extracellular signal-regulated kinase)

**Kir** inwardly rectifying draslíkový kanál (inwardly rectifying potassium channel)

**Kv** napětím řízený draslíkový kanál (voltage-gated potassium channel)

**LTP** dlouhodobá potenciace (long-term potentiation)

**mGluR** metabotropní glutamátový receptor (metabotropic glutamate receptor)

**NMDA** N-methyl-D-asparagová kyselina (N-methyl-D-aspartate)

**NMDAR** receptor N-methyl-D-asparagové kyseliny (N-methyl-D-aspartate receptor)

**PA-S** pregnanolon sulfát (pregnanolone sulfate)

**PKC** proteinkináza C (protein kinase C)

**PLC** fosfolipáza C (phospholipase C)

**PNS** periferní nervová soustava (peripheral nervous system)

**PS, PregS** pregnenolon sulfát (pregnenolon sulfate)

**PTX** pertussis toxin (pertussis toxin)

**RyR** ryanoidový receptor (ryanodine receptor)

**SMD1** steroidní modulační doména 1 (steroid modulatory domain 1)

**STP** krátkodobá potenciace (short-term potentiation)

**TRP** přechodný receptorový potenciál (transient receptor potential)

**TRPA** přechodný receptorový potenciál ankryrinový (transient receptor potential ankyrin)

**TRPC** přechodný receptorový potenciál kanonický (transient receptor potential canonical)

**TRPM** přechodný receptorový potenciál melastaninový (transient receptor potential melastanin)

**TRPML** přechodný receptorový potenciál mukolipinový (transient receptor potential mucolipin)

**TRPP** přechodný receptorový potenciál polycystický (transient receptor potential polycystic)

**TRPV** přechodný receptorový potenciál vaniloidní (transient receptor potential vanilloid)

# Obsah

1 Úvod.....	1
2 Stručný přehled charakteristik vybraných neurosteroidů a jejich struktury.....	3
2 Ionotropní glutamátové receptory .....	5
2.1 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na NMDA receptory .....	6
2.1.1 Působení pregnenolon sulfátu na NMDA receptory .....	6
2.1.2 Působení pregnanolon sulfátu na NMDA receptory .....	8
2.1.3 Působení epipregnanolon sulfátu na NMDA receptory .....	10
2.1.4 Působení dehydroepiandrosteron sulfátu na NMDA receptory .....	10
2.1.5 Vliv dalších sulfatovaných neurosteroidů na NMDA receptory .....	10
2.2 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na AMPA receptory .....	11
2.2.1 Vliv pregnenolon sulfátu na AMPA receptory .....	12
2.2.3 Další sulfatované neurosteroidy a jejich vliv na AMPA receptory .....	12
2.3 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na kainátové receptory .....	13
2.3.1 Vliv pregnenolon sulfátu na kainátové receptory .....	13
2.3.2 Vliv dalších sulfatovaných neurosteroidů na kainátové receptory.....	15
3 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na TRP kanály.....	17
3.1 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na kanál TRPV1 .....	17
3.2 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na kanál TRPM3 .....	18
3.3 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na kanál TRPC5 .....	20
4 Metabotropní receptory .....	21
4.1 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na sigma 1 receptor .....	21
4.2 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na metabotropní glutamátový receptor .....	22
4.3 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na vápníkové kanály .....	23
5 Kanály .....	24
5.1 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na draslíkové kanály .....	24
5.1.1 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na kanály Kir.....	24
5.1.2 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na napětím řízené draslíkové kanály.....	25
5.2 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na sodné kanály.....	26
6 Závěr.....	28
7 Seznam použité literatury .....	29

# 1 Úvod

Neurosteroidy jsou steroidy syntetizované v mozku a nervovém systému. Jejich označení zavedl francouzský fyziologem Etienne Baulieuem v roce 1981. Na základě pozorování bylo zjištěno, že steroidní látky jako pregnenolon, DHEA a jejich sulfatované a lipidové estery, se nacházely v nervové tkáni ve vyšších koncentracích než v plazmě (Corpechot, C. et al. 1981). Tyto výsledky byly podpořeny zjištěním, že i delší dobu po gonadektomii a adrenalectomii zůstaly koncentrace steroidu vysoké (Corpéchet et al. 1983). To vedlo k závěru, že steroidy mohou být syntetizovány *de novo* v CNS a PNS a nebo jsou schopny se zde akumulovat.

Steroidy jsou tvořeny žláзовými tkáněmi a přenášeny v krevním oběhu až k místu jejich působení. Mají schopnost procházet skrze cytoplazmatickou membránu pasivní difuzí. Vážou se buď na cytosolické nebo nukleární receptory, které se mohou vázat k DNA a tím ovlivňovat genovou expresi (Kawata et al. 2008). Charakteristickým rysem při jejich působení je jisté zpoždění v nástupu i odeznění jejich účinku způsobené právě aktivací transkripce nebo translace.

Neurosteroidy se vyznačují svou schopností modulovat neurotransmisi negenomickými mechanismy. Mají schopnost se rychle a přímo vázat na neurotransmiterové receptory – excitační i inhibiční. Právě zmíněná vlastnost vyvolala otázku, zda-li mohou neurosteroidy hrát regulační roli v synaptickém přenosu (Majewska et al. 1987).

Regulační role endogenních steroidů byla potvrzena a byla objevena řada receptorů a kanálů, na které tyto látky působí. Spolu se získaným zjištěním začalo být také zřejmé, že tyto látky mohou farmakologicky modulovat synaptický přenos. Konkrétní patologické důsledky spojené s receptory a kanály účastnicích se excitačního synaptického přenosu budou uvedeny vždy na začátku dané kapitoly.

Výskyt těchto látek v mozku byl a stále je zkoumán a je předmětem diskuzí. Sulfatované neurosteroidy jsou prokazatelně v mozku přítomny (Corpechot, C. et al. 1981; Corpéchet et al. 1983; Lanthier et al. 1986; Mathur et al. 1993; Higashi et al. 2001). Byl potvrzen výskyt enzymů zodpovědných za sulfataci steroidů – sulfotranferáz (Shimada et al. 2001), dále enzymů zodpovědných za regulaci této syntézy (Beaujean et al. 2002) a konečně i enzymů účastnicích se odstranění sulfátu – sulfatáz (Mortaud et al. 1996; Compagnone et al. 1997). Způsoby zjištění

konkrétní koncentrace těchto látek v mozku jsou stále problematické a z toho důvodu nebudou součástí bakalářské práce.

Práce se zaměří pouze na neurosteroidy sulfatované, které mají vliv na proteiny účastníci se excitačního synaptického přenosu. Vzhledem k nedostatku dat věnujícím se vlivu jmenovaných látek na některé typy zmíněných proteinů, je práce dělena do kapitol na základě dostupných dat, nikoliv klasického dělení těchto proteinů. Dále se práce nebude zabývat inhibičním synaptickým přenosem, ačkoli existuje mnoho studií dokazujících vliv sulfatovaných neurosteroidů na tento typ neurotransmise.

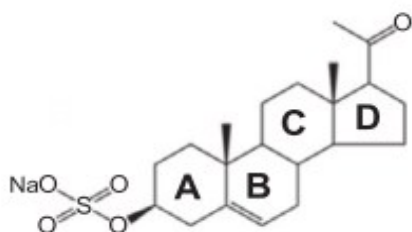
Cílem bude shrnout účinky sulfatovaných neurosteroidů na excitační synaptický přenos, poukázat na strukturní a funkční komponenty pravděpodobně zodpovědné za jejich účinek a nastínit jejich potenciální farmakologický význam. Konkrétně se text bude soustředit na srovnání účinků jednotlivých steroidů na jednotlivé receptory. Pro přehlednost bude daná problematika shrnuta do tabulek na konci každé kapitoly.



## 2 Stručný přehled charakteristik vybraných neurosteroidů a jejich struktury

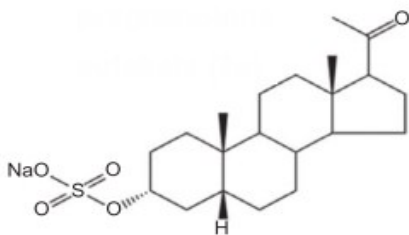
Na začátek této práce je vhodné uvést stručný přehled zmiňovaných neurosteroidů. Jak bude z dalších kapitol zřejmé, právě jejich strukturními vlastnostmi je určována jejich schopnost potenciace či inhibice daného receptoru. Dalším důvodem je zavedení jednotné nomenklatury látek vyskytujících se v následujících pasážích.

**Pregnenolon sulfát** nebo také pregn-5-en-3 $\beta$ -ol-20-on 3 $\beta$ -sulfát je endogenní neuromodulátor (Majewska et al. 1987). V literatuře je označován zkratkou PS nebo PregS. Jeho struktura včetně pojmenování jednotlivých kruhů steroidu je znázorněna na Obr. č. 1.



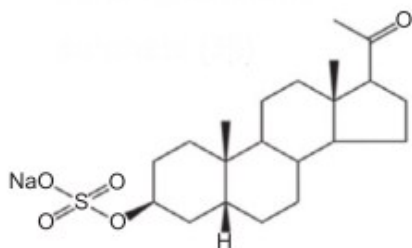
Obr. č. 1: Struktura pregnenolonu sulfátu (Převzato a upraveno dle Majeed et al.2010)

**Pregnanolon sulfát** neboli 3 $\alpha$  – hydroxy – 5 $\beta$  – pregnan - 20 - on sulfát je v literatuře obvykle označován jako 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S, popřípadě PA-S. Tento sulfatovaný neurosteroid se strukturně liší od pregnenolonu sulfátu: Vazba mezi uhlíkem C5 a C6 je v případě PA-S jednoduchá, v případě PS dvojná. Dalším rozdílem mezi těmito neurosteroidy je konfigurace na uhlíku C3 (Obr. č. 2).



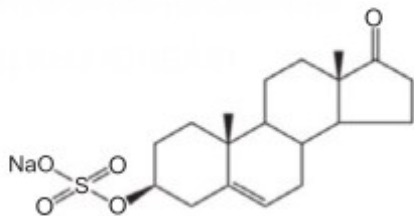
Obr. č. 2: Struktura pregnanolonu sulfátu (Převzato a upraveno dle Majeed et al.2010)

**Epipregnanolon sulfát** je často označován jako 3 $\beta$ 5 $\beta$ S, lze se setkat i se zkratkou Epipregnas. Strukturou je odlišný od PS pouze v absenci jedné dvojné vazby v kruhu B. Zároveň je stereoizomerem PA-S, což je zřejmé z orientace sulfátové skupiny v kruhu A (Obr. č. 3).



Obr. č.3: Struktura epipregnanolon sulfátu (Převzato a upraveno dle Majeed et al.2010)

**Dehydroepiandrosteron sulfát** je neurosteroid označovaný zkratkou DHEA-S. DHEA-S se liší od PS přítomností kyslíku místo acetylové skupiny na kruhu D. Obsahuje cis sulfát na kruhu A a dvojnou vazbu v kruhu B (Obr. č. 4).



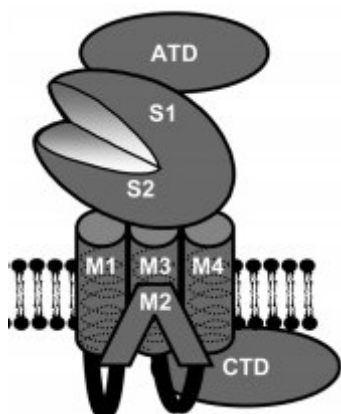
Obr. č. 4: Struktura dehydroepiandrosteron sulfátu (Převzato a upraveno dle Majeed et al.2010)

V práci budou zmíněny i mnohé další steroidy se schopností modulovat excitační synaptický přenos. Vzhledem k tomu, že množství dat věnujících se těmto látkám je velice omezené, budou ve větší míře zmíněny spíše okrajově.

## 2 Iontropní glutamátové receptory

Iontropní glutamátové receptory jsou ligandem ovládané iontové kanály, které váží glutamát – hlavní excitační neurontransmitter, v centrální nervové soustavě. Jsou zodpovědné za přenos většiny excitačních synapsí v CNS a dají se rozdělit na základě preferenční odpovědi k agonistovi. NMDA receptory preferenčně odpovídají na NMDA, což je *N*-methyl-asparagová kyselina odvozená od aspartátu. Oproti tomu mezi non-NMDA receptory patří AMPA a kainátové receptory, které preferenčně váží agonistu odpovídající jejich názvu. Dále jsou zde řazeny i delta receptory (F. S. Wu et al. 1991; Stephen F Traynelis et al. 2010).

Iontropní glutamátové receptory se skládají z extracelulární ATD (amino terminální domény), S1S2 domény, která má škeblovitý tvar a je schopna vázat ligand, tři transmembránových domén, smyčky a intracelulární C terminální domény (Cameron et al. 2012).



Obr. č. 5: Obecná struktura ionotropních glutamátových receptorů (Převzato a upraveno dle Chen 2005)

Regulace aktivity ionotropních glutamátových receptorů je velice důležitá. Nadměrná nebo naopak nedostatečná aktivita může vést k patologickým stavům. Jejich normální aktivita je zodpovědná za proces synaptogeneze, synaptickou plasticitu, učení a pamět (Lynch 2004; S.F. Traynelis et al. 2010; Huganir et al. 2013). Zvýšená aktivita těchto receptorů může vést k excitotoxicitě (Olney 1969), jedná se o proces, při kterém jsou nervové bunky ničeny nebo zabity nadměrnou stimulací neurotransmiterem, což je spojeno s influxem vápníku do buňky (Choi 1987). Excitotoxicita je zmiňována v souvislosti se vznikem mnoha patologických stavů

– neurodegenerativních onemocnění, mozkové mrtvice, traumatické poškození mozku a další (Parsons et al. 2014).

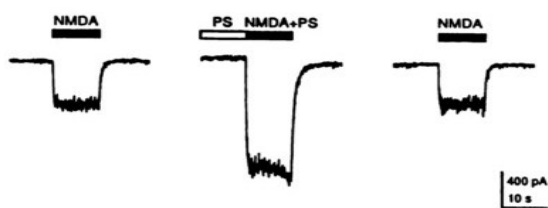
## 2.1 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na NMDA receptory

NMDA receptor je modulován mnoha různými sloučeninami. Příkladem mohou být polyaminy (Sprosen et al. 1990), redoxní činidla (Aizenman et al. 1989), kyselina arachidonová (Miller et al. 1992), MK-801 (Huettner et al. 1988) nebo polyamin spermin (Sprosen et al. 1990).

NMDA receptor je heterotetramer. Funkční NMDA receptor vyžaduje minimálně spojení jedné GluN1 podjednotky s nejméně jednou GluN2 podjednotkou (McIlhinney et al. 1996). Obecně se tyto receptory skládají z různých kombinací tří podjednotkových typů: GluN1, GluN2 a/nebo GluN3 (Dingledine et al. 1999). Procesem splicingu vzniká osm různých variant GluN1 genu. Podjednotku GluN2 kódují čtyři různé geny – GluN2A, GluN2B, GluN2C a GluN2D.

### 2.1.1 Působení pregnenolon sulfátu na NMDA receptory

Tento neurosteroid má schopnost zvyšovat NMDA odpovědi (F. S. Wu et al. 1991; Yaghoubi et al. 1998; Malayev et al. 2002). Potenciace v daném případě je velice silná, konkrétní hodnota byla 197% změna v proudových odpovědích při použití 100 $\mu$ M PS (Obr. č. 6), hodnota ale v různých pracích variuje.



Obr. č. 6: Proudové odpovědi NMDA receptorů po aplikaci 100 $\mu$ M pregnenolonu sulfátu na NMDAR (Převzato a upraveno dle Wu et al. 1991)

PS působí na NMDA receptory přímo extracelulárně a na odlišných modulačních místech než agonista glutamát (Park-Chung et al. 1997). Existuje práce, která uvádí i možnost intracelulárního působení PS (Wong et al. 1994). Místo vazby PS je odlišné od místa vazby sperminu, kyseliny arachidonové a místa pro redoxní činidla (Park-Chung et al. 1997). PS

nepůsobí skrze glycinové vazebné místo, což je ko-agonista NMDA receptorů (F. S. Wu et al. 1991).

Zajímavé je, že pregnenolon nemá modulační aktivitu NMDA, z čehož zřejmě vyplývá, že negativně nabitá sulfátová skupina na uhlíku C3 pregnenolon sulfátu má význam pro jeho aktivitu (Irwin et al. 1994; Park-Chung et al. 1997). Tato domněnka byla potvrzena použitím látek se substitucí negativně nabitě skupiny na C3. Všechny takto substituované látky mají schopnost potencovat NMDA receptory (Weaver et al. 2000).

Dále byla testována podjednotková závislost účinku PS. V pokusu byl použit diheteromerní receptor vzniklý spojením GluN1 podjednotky a podjednotek GluN2A – GluN2D. Bylo zjištěno, že v případě spojení GluN1 a GluN2A a GluN1 a GluN2B dochází k potenciaci pregnenolon sulfátem. Oproti tomu spojení GluN1 a GluN2C a GluN1 a GluN2D vedlo k inhibičnímu efektu po aplikaci PS. Získané výsledky vedly k závěru, že místo vazby pregnenolon sulfátu je s největší pravděpodobností částečně nebo úplně lokalizované na podjednotce GluN2. Modulace pregnenolon sulfátem NMDA receptoru je tedy podjednotkově závislá (Malayev et al. 2002). Později byla na GluN2B podjednotce nalezena konkrétní oblast s J/K helixy a M4 transmembránovou doménou zodpovědná za potenciační efekt PS na NMDA. Byla pojmenována SMD1 – steroidní modulační doména. (Jang et al. 2004).

Tento steroid se liší ve své schopnosti potenciace NMDA odpovědí na základě stavu receptoru, na který působí. Při aplikaci PS na neaktivní NMDA receptor je potenciace pětinasobná a jeho deaktivace je dvakrát pomalejší. Pokud se aplikuje stejná koncentrace pregnenolon sulfátu na receptor aktivovaném 1 mM glutamátem, má pouze malý efekt. Steroid je nejspíše schopen zvýšit pravděpodobnost otevření kanálu. Po aktivaci NMDA receptoru se snižuje jeho afinita k PS (Horak et al. 2004).

Účinek pregnenolon sulfátu může být ve vyšších koncentracích inhibiční na GluN1/GluN2B receptorech. Tento účinek je charakteristický svým velmi rychlým nástupem a zároveň i rychle ustupuje (Horak et al. 2004). Inhibiční efekt na rozdíl od potenciačního není závislý na působení glutamátu. Výše zmiňovaný účinek PS závislý na aktivaci NMDA receptoru je zřejmě způsoben právě inhibičním účinkem PS. Koaplikace glutamátu a PS, která vykazuje pouze malý efekt PS, je viditelně způsobená inhibiční aktivitou pregnenolonu sulfátu. Dochází k sečtení potenciačního a inhibičního efektu PS. Při bližším zkoumání původu tohoto efektu bylo zjištěno, že M3-M4 smyčka GluN2 podjednotky ovládá nejen potenciační, ale zároveň i inhibiční efekt pregnenolon sulfátu (Horak et al. 2006).

### 2.1.2 Působení pregnanolon sulfátu na NMDA receptory

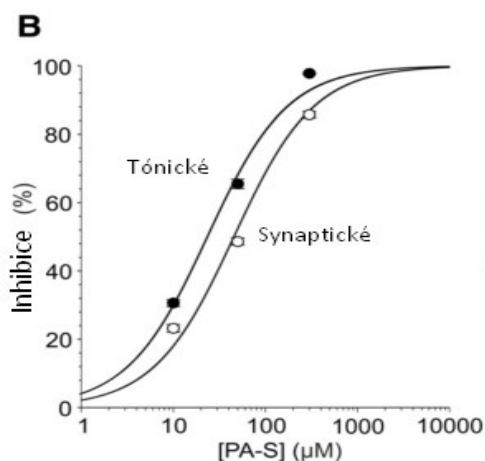
Pregnanolon sulfát (PA-S) je neurosteroid s inhibičním efektem NMDA receptorů (Park-Chung et al. 1994, 1997; Yaghoubi et al. 1998; Weaver et al. 2000; Petrovic et al. 2005). Inhibice proudů je 66% při použití 100  $\mu$ M PA-S (Park-Chung et al. 1994). Bylo zjištěno, že inhibiční účinek pregnanolon sulfátu na NMDA receptor je alosterický, napěťově nezávislý a nekompetitivní s NMDA vazebným místem. Byla potvrzena jeho nezávislost na glycinovém modulačním místě (Park-Chung et al. 1994).

Obecně je působení inhibičních steroidů vázáno na extracelulární stranu NMDA receptorů (Park-Chung et al. 1997). Vazebné místo pro inhibiční steroidy je lokalizováno na GluN2 podjednotce (Malayev et al. 2002). Konkrétní lokace inhibičního vazebného místa je nejistá. Byly publikovány informace o inhibičním efektu vázáném na M3-M4 extracelulární smyčku (Horak et al. 2006), ale zároveň existuje práce tvrdící pravý opak. Při vazbě PS k NMDA receptoru dochází ke konformační změně, po které se pregnanolon sulfát snáze váže k receptoru. Na druhou stranu při vazbě PA-S dochází ke vzniku konformační změny, jež naopak ztěžuje vazbu PS. Získané zjištění tedy indikuje, že inhibiční vazebné místo PA-S a PS není totožné (Cameron et al. 2012). Stejně jako v případě PS je účinek tohoto steroidu podjednotkově závislý. PA-S má schopnost více inhibovat GluN1-1a/GluN2C-D receptory než GluN1-1a/GluN2A-B (Petrovic et al. 2005).

Aktivita pregnanolon sulfátu je závislá na přítomnosti agonisty. Inhibiční efekt je tzv. use-dependentní, míra inhibice je závislá na aktivaci receptoru. Kinetika vazby PA-S k receptoru s navázaným ligandem je odlišná oproti receptoru bez ligandu (Petrovic et al. 2005). Právě schopnost PA-S být více potentní inhibitor na aktivovaných NMDA byla předmětem dále zmíněné studie.

Aktivita NMDA receptorů může být synaptická nebo tónická. Tyto dvě aktivity se liší délkou přítomnosti glutamátu – synaptický glutamát je přítomen pouze ~ 1 ms, zatímco tónický je přítomen v řádech sekund až minut, popřípadě i déle. Synaptická aktivita je důležitá pro synaptogenezi, synaptickou plasticitu, učení a paměť (Lynch 2004; S.F. Traynelis et al. 2010; Hugarir et al. 2013). Oproti tomu tónická aktivita NMDA receptorů může vést k excitotoxicitě způsobené zvýšenou hladinou glutamátu (Olney 1969) a zároveň závislé na vstupu vápníku do buňky (Choi 1987; Vyklícký et al. 2016). Právě aktivace tónické aktivity NMDA receptorů může vést k rozvoji patologických stavů (Parsons et al. 2014). Vzhledem k charakteru synapticky aktivovaných NMDA receptorů je žádoucí, aby při inhibici byly ponechány intaktní.

Právě takovým inhibítorem je PA-S, preferenčně inhibuje tónicky aktivované NMDA receptory před synaptickými (Obr. č. 7). Zmíněná vlastnost je klíčová k potenciálnímu využití při terapeutických účelech (Vyklícky et al. 2016). Inhibitory NMDA receptorů, které nevykazují tyto vlastnosti, přináší psychomimetické symptomy, neboť dochází i k inhibici synaptického přenosu (Lipton 1993; Michael A. Rogawski 1993; M.A. Rogawski et al. 2006; Manahan-Vaughan et al. 2008).



Obr. č. 7: Koncentračně závislá inhibice tonických a synaptických NMDA receptorů pomocí PA-S modelovaná pomocí pokusu s aplikovaným glutamátem

Jako model pro tónické NMDAR byla použita 5sek preaplikace glutamátu, pro synaptické pouze rychlá aplikace glutamátu po dobu 10 ms (Převzato a upraveno dle Vyklícky et al. 2016).

Samostatnou otázkou zůstává, jaké strukturní prvky stojí za inhibičním účinkem PA-S. Byly prováděny pokusy o modelování syntetických látek odvozených od fenantrenu. Tyto sloučeniny jsou strukturně podobné, napodobují strukturu steroidu a mají tedy potenciál být i více potentním inhibítorem než PA-S. Látky disponující alespoň kruhem ABC steroidní kostry, byly schopné inhibovat NMDA receptor, což indikuje, že kruh D není pro inhibiční efekt esenciální (Slavikova et al. 2016). Jak již bylo uvedeno na začátku práce, rozdíl jedné dvojné vazby a konfigurace na uhlíku C3 z něj činí, na rozdíl od PS, inhibitor.

V práci věnující se syntetickým analogům PA-S byl testován vliv C3 analogů na NMDA receptor a s tím byly odhaleny další strukturní požadavky. Všechny látky, které měly na uhlíku C3 záporně nabitou skupinu, inhibovaly NMDA odpovědi na GluN1/GluN2B receptorech. Byly testovány dva analogy s kladně nabitou C3 skupinou. Obě látky inhibovaly NMDA

odpovědi na GluN1/GluN2B receptorech. Při testování látek bez náboje bylo zjištěno, že pro inhibiční účinky PA-S je esenciální přítomnost náboje (Borovska et al. 2012).

### **2.1.3 Působení epipregnanolon sulfátu na NMDA receptory**

Epipregnanolon sulfát je neurosteroid s inhibiční aktivitou NMDA receptorů (Park-Chung et al. 1997; Weaver et al. 2000). Konkrétně byla naměřena hodnota 50% inhibice při použití 100  $\mu$ M steroidu (Park-Chung et al. 1997). Působení tohoto neurosteroidu je napětově nezávislé a současně k jeho funkci není potřeba opakované otevření NMDA kanálu (Park-Chung et al. 1997).

Epipregnanolon sulfát se patrně váže na vnější stranu plazmatické membrány. Tato interakce není kompetitivní s místem pro spermin, kyselinu arachidonovou ani redoxní činidla. Nepůsobí ani skrze vazebné místo pro MK-801,  $Mg^{2+}$  nebo místo pro glycin. Ačkoli je velice strukturně podobný PS, tak žádné jejich vazebné místo není společné (Park-Chung et al. 1997). Přesný mechanismus účinku epipregnanolon sulfátu není dosud objasněn.

### **2.1.4 Působení dehydroepiandrosteron sulfátu na NMDA receptory**

Dehydroepiandrosteron sulfát (DHEA-S) je neurosteroid se schopností pozitivně modulovat NMDA receptory. Potenciace je oproti PS nižší, konkrétně 28% při použití 100  $\mu$ M DHEA-S (Park-Chung et al. 1994). Pochopitelně existují i data deklarující, že na tyto receptory DHEA-S nemá účinek (Yaghoubi et al. 1998).

Má roli ve frekvenčně dependentní LTP. Konkrétně bylo zjištěno že potkani, kterým byl podáván DHEA-S, měli zvýšené hodnoty intracelulární koncentrace vápníku, jenž vtéká do buňky skrze NMDA kanály. Potenciace NMDA receptorů dehydroepiandrosteron sulfátem je dependentní na tyrosinkináze Src (L. Chen, Dai, et al. 2006). Frekvenčně dependentní LTP je zřejmě řízena NMDA zprostředkovanou amplifikací signálu skrze opakující se cyklus NMDA receptor- $Ca^{2+}$ /Src/NMDA receptor  $Ca^{2+}$  (L. Chen, Miyamoto, et al. 2006).

### **2.1.5 Vliv dalších sulfatovaných neurosteroidů na NMDA receptory**

Epipregnanolon sulfát i PA-S jsou steroidy, které jsou redukovány na uhlíku C5 v pozici  $\beta$ . Při testování steroidu 3 $\beta$ 5 $\alpha$ S (epiandrosteron sulfát) bylo zjištěno, že má opačné tzn. potenciační účinky NMDA receptorů (Park-Chung et al. 1997; Yaghoubi et al. 1998; Weaver et al. 2000). Oproti tomu 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ S (allopregnanolon sulfát) vykazuje slabě inhibiční účinky (Park-Chung et al.



1997; Weaver et al. 2000), ale existuje i práce, ve které se uvádí, že nemá na NMDA receptor účinky žádné (Yaghoubi et al. 1998). Závěr z provedeného pozorování je, že interakce NMDA receptorů s těmito steroidy je stereospecifická na uhlíku C5 (Park-Chung et al. 1997).

Steroid	Účinky na NMDA	Reference
<b>Pregnenolon sulfát</b>	silná potenciace	(F. S. Wu et al. 1991; Yaghoubi et al. 1998; Malayev et al. 2002)
<b>Pregnanolon sulfát</b>	inhibice	(Park-Chung et al. 1994, 1997; Yaghoubi et al. 1998; Weaver et al. 2000; Petrovic et al. 2005)
<b>Epipregnanolon sulfát</b>	inhibice	(Park-Chung et al. 1997; Weaver et al. 2000)
<b>Dehydroepiandrosteron sulfát</b>	potenciace/bez účinku	(Park-Chung et al. 1994; Yaghoubi et al. 1998)
<b>Epiandrosteron sulfát (3<math>\beta</math>5<math>\alpha</math>S)</b>	potenciace	(Park-Chung et al. 1997; Yaghoubi et al. 1998; Weaver et al. 2000)
<b>Allopregnanolon sulfát (3<math>\alpha</math>5<math>\alpha</math>S)</b>	slabá inhibice/bez účinku	(Park-Chung et al. 1997; Yaghoubi et al. 1998; Weaver et al. 2000)

Tabulka 1: Účinky sulfatovaných neurosteroidů na NMDA receptory

## 2.2 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na AMPA receptory

AMPA receptory, jejichž hlavním agonistou je  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalon, umělý analog glutamátu, patří mezi non-NMDA receptory a účastní se převážně rychlého excitačního synaptického přenosu v mozku. Tyto receptory obvykle tvoří heterotetramery a skládají se z podjednotek GluA1, GluA2, GluA3 a GluA4. Charakteristicky vytváří symetrické „dimery dimerů“ podjednotky GluA2 a jednu z podjednotek GluA1, GluA3 nebo GluA4 (Mayer 2005; Greger et al. 2007; Stephen F Traynelis et al. 2010). Patologické stavy, které se váží k disfunkci AMPA receptorů, jsou stejně jako u ostatních ionotropních glutamátových receptorů, spojeny s excitotoxicitou. Modulátory AMPA receptorů by mohly mít potenciál při léčbě amyotrofické laterální sklerózy, Alzheimerovy choroby, epilepsie, ischemie (Chang et al. 2012).

### **2.2.1 Vliv pregnenolon sulfátu na AMPA receptory**

Pregnenolon sulfát má schopnost inhibovat aktivitu AMPA receptorů (F. S. Wu et al. 1991; Yaghoubi et al. 1998), byla naměřena 29% změna v proudové odpovědi při použití 100 $\mu$ M PS (F. S. Wu et al. 1991). Při nahrazení sulfátové skupiny na C3 za hemisukcinát je míra inhibice přibližně stejná (Yaghoubi et al. 1998).

Tento endogenní neurosteroid má schopnost se vázat přímo na AMPA receptor, což potvrdil pokus s rekombinantními receptory obsahujícími GluA1 a GluA3 podjednotky (Yaghoubi et al. 1998). Pro zjištění konkrétního místa vazby PS na AMPA receptor byly vytvořeny rozpustné GluA2-S1S2 domény, vzniklé spojením S1 domény s S2 pomocí glycinthreoninového linkeru. Na základě fluorescenčních měření byla potvrzena hypotéza, že se pregnenolon sulfát váže k S1S2 doméně GluA2 podjednotky a způsobuje tím konformační změnu. Zároveň se potvrdilo, že je toto místo odlišné od vazby agonisty glutamátu (Spivak et al. 2004). Při dalších studiích byl objevena také jeho schopnost vázat se k ATD. Alosterické ligandy se typicky vážou k ATD NMDA receptorů, ale v případě AMPA receptorů je toto první práce publikující totéž o těchto receptorech (Cameron et al. 2012).

### **2.2.2 Vliv pregnanolon sulfátu na AMPA receptory**

PA-S má inhibiční účinky na AMPA receptory (Park-Chung et al. 1994; Yaghoubi et al. 1998), konkrétně 29% změna v proudových odpovědích při použití 100 $\mu$ M PA-S (Park-Chung et al. 1994). V pokusu s rozpustnou S1S2 doménou byly testovány také vazebné vlastnosti tohoto neurosteroidu. Závěrem bylo zjištění, že pregnanolon sulfát se stejně jako PS váže k S1S2 doméně GluA2 podjednotky AMPA receptorů (Spivak et al. 2004). V obdobném pokusu jako s PS byl zkoumán jeho vliv na ATD a potvrzena hypotéza, že má také vazebné místo na ATD AMPA receptorů (Cameron et al. 2012).

### **2.2.3 Další sulfatované neurosteroidy a jejich vliv na AMPA receptory**

Další steroidní látkou schopnou inhibice receptorů AMPA, je dehydroepiandrosteron sulfát. Tento steroid má tyto účinky ve srovnání s PS a PA-S nižší (Yaghoubi et al. 1998).

Všechny jmenované neurosteroidní látky vykazovaly negativní modulaci těchto receptorů. Negativně nabitá sulfátová skupina ale nemusí znamenat vždy inhibiční účinky

AMPA receptorů. Důkazem je 17 $\beta$ -estradiol-3- sulfát nevykazující žádný efekt na GluA1 a GluA3 AMPA receptory (Yaghoubi et al. 1998).

Steroid	Účinky na AMPAR	Reference
<b>Pregnenolon sulfát</b>	inhibice	(F. S. Wu et al. 1991; Yaghoubi et al. 1998)
<b>Pregnanolon sulfát</b>	inhibice	(Park-Chung et al. 1994; Yaghoubi et al. 1998).
<b>Dehydroepiandrosteron sulfát</b>	inhibice	(Yaghoubi et al. 1998)
<b>17<math>\beta</math>-estradiol-3- sulfát</b>	bez účinku	(Yaghoubi et al. 1998)

Tabulka 2: Účinky sulfatovaných neurosteroidů na AMPA receptory

## 2.3 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na kainátové receptory

Kainátové receptory jsou ionotropní glutamátové receptory aktivované agonistou kainátem. Presynaptické kainátové receptory se vyskytují na excitačních i inhibičních synapsích, zatímco postsynaptické jsou spíše lokalizované na excitačních synapsích (Lerma et al. 2001). Stejně jako další ionotropní glutamátové receptory jsou charakteristické díky tetramerní struktuře. Existuje pět typů kainátových podjednotek: GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 a GluK5 (S.F. Traynelis et al. 2010). Příčinou patologických stavů spojenou s kainátovými receptory je mnohdy excitotoxicita. Látky působící jako antagonisty kainátových receptorů mají potenciál při léčbě bolesti (Simmons et al. 1998; Palecek et al. 2004), epilepsie (Smolders et al. 2002), neurodegenerativních onemocnění (Chalmers et al. 1990; Wagster et al. 1994; Rubinsztein et al. 1997; Aronica et al. 1997) a mnohých dalších onemocnění.

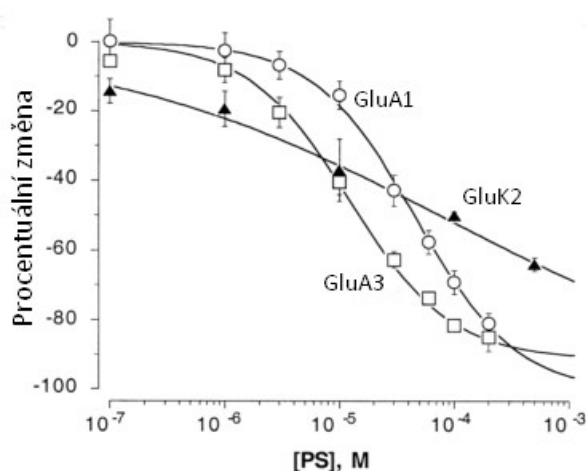
### 2.3.1 Vliv pregnenolon sulfátu na kainátové receptory

Pregnenolon sulfát je negativní modulátor kainátových receptorů (F. S. Wu et al. 1991; F. Wu et al. 1997; Yaghoubi et al. 1998). Inhibice je nicméně nepatrná a hodnota je téměř totožná s inhibicí neurosteroidu na AMPA receptoru, konkrétně 25% změna v proudových odpovědích při použití 100  $\mu$ M PS (F. S. Wu et al. 1991).

Aplikovaný pregnenolon v maximální možné rozpustné koncentraci má pouze velmi malý až žádný efekt na kainátové receptory. Sulfátová skupina je prokazatelně esenciální pro inhibici těchto receptorů pregnenolon sulfátem (F. Wu et al. 1997).

V pozdější publikaci byla naměřena maximální inhibice kainátových odpovědí 38 % při použití 100  $\mu$ M PS (Obr. č. 8). Kainát působí na odlišných místech než PS. Působení PS je napětově independentní a zároveň nezávislé na přítomnosti agonisty kainátu (F. Wu et al. 1997). Při použití GYKI 52466, látky schopné inhibovat kainátové odpovědi (Donevan et al. 1993), zároveň s PS, byl zřetelný aditivní inhibiční účinek, což indikuje, že místo vazby těchto dvou inhibitorů není společné. Na základě získaných zjištění je možné usuzovat vlastní modulační místo PS na svých kainátových receptorech (F. Wu et al. 1997). Nicméně je potřeba zdůraznit, že látka GYKI 52466 je inhibitorem také AMPA odpovědí, tudíž výsledek není jednoznačný a mohlo by se jednat o smíšené účinky AMPA a kainátových receptorů.

Při zkoumání působení PS na rekombinantních kainátových receptorech bylo potvrzeno, že inhibice je na GluK2 podjednotce nekompetitivní. Zároveň není tento receptor tak citlivý k působení PS jako GluA1 a GluA3 AMPA receptorů (Obr. č. 8). Je evidentní, že PS působí na pozorované receptory jiným mechanismem než na AMPA receptory. Přestože PS jeho aktivitu inhibuje, pregnenolon hemisukcinát, který se liší nahrazením C3 sulfátové skupiny za hemisukcinátovou, má rovněž schopnost inhibice, ačkoli je výrazně nižší. (Yaghoubi et al. 1998).



Obr. č. 8: Koncentračně závislá inhibice AMPA a kainátových receptorů

Při testování účinku PS na GluA1 a GluA3 receptory je zřejmé, že při vyšších koncentracích inhibitoru je míra inhibice vyšší u AMPA receptorů než u testovaných GluK2 receptorů (Převzato a upraveno dle Yaghoubi et al. 1998).

### 2.3.2 Vliv dalších sulfatovaných neurosteroidů na kainátové receptory

Účinek pregnanolon sulfátu na kainátové odpovědi je inhibiční. Míra inhibice je přibližně stejná jako při použití pregnenolon sulfátu (Yaghoubi et al. 1998; Park-Chung et al. 1994).

Rozporuplným neurosteroidem je dehydroepiandrosteron sulfát. Existují data publikující jeho potenciační, ale zároveň i inhibiční účinky. Konkrétně bylo v roce 1997 publikováno, že DHEA-S mírně potencuje kainátové odpovědi (F. Wu et al. 1997), přičemž o rok později z dat vyplývá, že je tento neurosteroid mírně inhibiční (Yaghoubi et al. 1998).

Dalšími testovanými steroidy byl 17 $\alpha$ -Estradiol-3-sulfát. Steroid vykazuje nízké až žádné schopnosti inhibice těchto receptorů. Na základě tohoto zjištění je možné odvodit, že stejně jako v případě AMPA receptorů, nemusí sulfátová skupina steroidu nutně znamenat schopnost inhibovat receptorové proudy (Yaghoubi et al. 1998).

Steroid	Účinky na kainátové receptory	Reference
<b>Pregnenolon sulfát</b>	inhibice	(F. S. Wu et al. 1991; F. Wu et al. 1997; Yaghoubi et al. 1998)
<b>Pregnanolon sulfát</b>	inhibice	(Yaghoubi et al. 1998; Park-Chung et al. 1994).
<b>Dehydroepiandrosteron sulfát</b>	mírná potenciace/mírná inhibice	(Yaghoubi et al. 1998; F. Wu et al. 1997)
<b>17<math>\alpha</math>-estradiol-3- sulfát</b>	nízká inhibice/ bez účinku	(Yaghoubi et al. 1998)

Tabulka 3: Účinky sulfatovaných neurosteroidů na kainátové receptory

Ionotropní glutamátové receptory jsou modulované sulfatovanými neurosteroidy. Z výše zmiňovaných dat je zřejmé, že jejich působení je s největší pravděpodobností přímé.

Konkrétní místo vazby steroidu není vždy známo, ale data indikují vazebná místa odlišná od vazby agonisty. Neurosteroidní látky mají očividně na receptoru své vlastní vazebné místo. V případě PS a PA-S se jedná o vazbu ke GluN2 podjednotce NMDA receptorů a S1S2 doméně GluA2 podjednotky AMPA receptorů.

Strukturní komponenty zodpovědné za inhibici či potenciaci se liší pro každý receptor. Sulfatované neurosteroidy na NMDA receptorech mohou mít potenciační, inhibiční, popř. žádné účinky (Tabulka 1). Oproti tomu na AMPA receptory mají sulfatované neurosteroidy jen inhibiční nebo žádné účinky (Tabulka 2). Na kainátových receptorech je situace obdobná jako na AMPAR (Tabulka 3), ale zde už se nejedná o stejný mechanismus účinku (Obr. č. 8). Bylo zjištěno, že pro potenciační účinky na NMDA receptorech PS je nutná negativně nabitá skupina na uhlíku C3, oproti tomu pro inhibiční účinky PA-S na NMDAR je nezbytný ABC kruh steroidní kostry a jakýkoli náboj na tomtéž uhlíku. Regulace ionotropních glutamátových receptorů je důležitá z mnoha hledisek. Potenciační steroidy mohou mít prokognitivní funkci, význam pro synaptickou plasticitu a mnohé patologické stavy jako Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba. Zatímco inhibiční steroidy jsou protektivní vůči excitotoxicitě a z toho vyplývající buněčné smrti.

### **3 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na TRP kanály**

TRP kanály (z angl. Transient receptor potencial) jsou iontové kanály, které jsou propustné pro více typů iontů např. sodné, vápenaté nebo hořečnaté. Existuje mnoho typů těchto kanálů a obecně se dají rozdělit na sedm podskupin: TRPC, TRPV, TRPA, TRPM, TRPP, TRPML, TRPN. Mnohé z nich jsou schopné se podílet na pocitu bolesti, chladu, tepla, chutě nebo tlaku (Ramsey et al. 2006).

#### **3.1 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na kanál TRPV1**

Kapsaicinový receptor TRPV1 je receptor patřící do skupiny TRP kanálů, který se mimo jiné účastní vnímání teploty těla. Tento receptor má význam při nocicepci (Caterina et al. 2000) a je spojen se zánětem vyvolanou tepelnou hyperalgezií (Davis et al. 2000) – stav tepelné přecitlivělosti. Látky schopné inhibice TRPV1 kanálu by mohly pomoci redukovat pocit bolesti a sloužit jako prevence hyperalgie.

Jedním z testovaných steroidů byl pregnenolon sulfát, steroid se schopností rychle a reverzibilně inhibovat kapsaicinové odpovědi. Proces inhibice je závislý na množství použitého pregnenolon sulfátu, přičemž maximální inhibice kapsaicinového receptoru je 65% při použití 100 $\mu$ M PS (S. Chen et al. 2004).

Stejně jako v předchozích případech byla snaha zjistit více o konkrétním mechanismu působení tohoto steroidu. Pregnenolon sulfát se váže k extracelulární straně receptoru. Vazebné místo pro agonistu kapsaicin se nachází na intracelulární straně receptoru (Jung et al. 1999). Tento fakt koreluje s tvrzením, že vazebné místo pro kapsaicin není shodné s místem vazby PS. Mimo to bylo zjištěno, že inhibice je napětově nezávislá (S. Chen et al. 2004).

Na TRPV1 receptoru byl testován účinek i dalších steroidních látek. Při aplikaci pregnenolonu byla místo inhibice pozorována potenciace. Konkrétně se jednalo o zvýšení o přibližně 40 % těchto proudů při použití 25 $\mu$ M pregnenolonu. Dehydroepiandrosteron má schopnost inhibovat TRPV1 (S. Chen et al. 2004). Při testování vlivu pregnenolonu sulfátu na vaniloidní receptory TRPV4 a TRPV6 se neprokázal žádný účinek (Wagner et al. 2008).

Steroid	Účinky na TRPV1	Reference
PS	inhibice	(S. Chen et al. 2004)
DHEA-S	inhibice	(S. Chen et al. 2004)

Tabulka 4: Účinky sulfatovaných neurosteroidů na TRPV1 kanál

### 3.2 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na kanál TRPM3

Dalším z testovaných kanálů z rodiny TRP byl TRPM3. TRPM3 je kanál, který se hojně vyskytuje v mozku, ale současně je lokalizován i v periferních tkáních (Lee et al. 2003; Grimm et al. 2003; Oberwinkler et al. 2007). Jmenované kanály mají úlohu při diferenciaci oligodendrocytů a myelinizaci v CNS (Hoffmann et al. 2010). Je prokázáno, že steroidní látky mají presynaptický účinek na zvýšení hladiny intracelulárního vápníku a na základě toho mít potenciální vliv na výlev glutamátu nebo inzulinu (viz dále) (Wagner et al. 2008; Zamudio-Bulcock, Everett, et al. 2011).

Pregnenolon sulfát má schopnost aktivovat tyto kanály (Wagner et al. 2008; Majeed et al. 2010). Jedná se o velice rychlou aktivaci (pod 100 ms), což indikuje přímou aktivaci TRPM3 kanálu PS, lokalizovanou výhradně na extracelulární stranu plazmatické membrány (Wagner et al. 2008)

Pregnenolon sulfát má vliv na výlev glutamátu. Ten je způsoben TRPM3 kanály v kortexu mozečku, kde byl také potvrzen jejich výskyt. Při použití blokátoru TRP kanálu dochází k blokaci výlevu glutamátu. Je možné, že při fyziologických podmínkách vývoje synapsí jsou TRPM3 kanály aktivovány PS, neboť průběh procesů je závislý na vápníkové signalizaci (Zamudio-Bulcock, Everett, et al. 2011). Při bližším zkoumání Purkyňových buněk mozečku se ukázalo, že PS zvyšuje intracelulární hladinu vápníku v presynaptickém terminálu, což bylo zjištěno skrze miniaturní excitační postsynaptické proudy AMPA receptorů. Efekt není způsoben napěťově řízenými vápníkovými kanály, nýbrž jsou za ní zodpovědné kanály TRP (Zamudio-Bulcock and Valenzuela 2011).

Fakt, že se steroidní látky vyskytují v mozku, je známý již dlouhou dobu, ale otázka, zda mohou tyto látky působit i v periferních tkáních na stejné receptory, přinesla zajímavé odpovědi. Byly testovány buněčné linie Ins1 odvozené od pankreatických  $\beta$  buněk a vliv PS na TRPM3 kanál. Aplikace pregnenolonu sulfátu způsobila vtok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do těchto buněk.



Obdobných výsledků bylo dosaženo při testování vlivu PS na pankreatické buňky. Aplikace pregnenolonu sulfátu na glukózou indukované buňky pankreatu způsobuje elevaci intracelulární hladiny vápníku, následně doprovázenou exocytózou inzulinových vesíků. Velice důležitá na tomto indukovaném výlevu inzulinu je jeho specificita. Kanál TRPM3 je zatím jediným známým pankreatickým TRP kanálem, který je možno přímo farmakologicky aktivovat. Účinky pregnenolonu sulfátu by tedy mohly mít potenciální využití i v periferních tkáních (Wagner et al. 2008).

V práci věnující se vztahu těchto receptorů a jejich struktury bylo testováno velké množství látek – sulfatovaných i nesulfatovaných. Většina nesulfatovaných nemá na receptor účinky kvůli odlišným strukturním znakům, ačkoli existují i takové, které mají potenciační účinky (Wagner et al. 2008). Pro přehlednost nebudou v textu uvedeny všechny testované steroidy, pouze budu demonstrovat jejich účinek v souhrnné tabulce (Tabulka 5).

V případě TRPM3 kanálu nezáleží pouze na přítomnosti sulfátové skupiny steroidu, ale i na jejím umístění. Sulfátová skupina v pozici *cis* kruhu A je pro schopnost aktivace TRPM3 receptorů důležitá. Dalším požadavkem je dvojná vazba v kruhu B, acetylová skupina v kruhu D a steroidní kostra (Majeed et al. 2010).

Při testování vlivu PS na další receptory z rodiny TRPM nebyla pozorována schopnost aktivace těchto receptorů. Konkrétně se jednalo o TRPM2, TRPM7 a TRPM8. Z toho lze odvodit, že potenciační schopnosti PS nejsou obecným znakem TRP kanálů (Wagner et al. 2008).

Steroid	Účinky na TRPM3	Reference
<b>PS</b>	silná potenciace	(Wagner et al. 2008; Majeed et al. 2010)
<b>PA-S</b>	slabá potenciace	(Majeed et al. 2010)
<b>DHEA-S</b>	slabá potenciace	(Wagner et al. 2008; Majeed et al. 2010)
<b>Epipregnanolon sulfát</b>	slabá potenciace	(Majeed et al. 2010)
<b>17<math>\beta</math>-oestradiol sulfát</b>	bez účinku	(Majeed et al. 2010)
<b>Kortikosteron-21 sulfát</b>	bez účinku	(Majeed et al. 2010)
<b>Epiandrosteron sulfát</b>	potenciace	(Majeed et al. 2010)
<b>Androsteron sulfát</b>	bez účinku	(Majeed et al. 2010)

Tabulka 5: Účinky sulfatovaných neurosteroidů na TRPM3 kanál

### 3.3 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na kanál TRPC5

TRPC5 je protein patřící do skupiny TRP kanonických kanálů a je schopen tvořit neselektivně propustný vápníkový kanál. Funkce těchto kanálů není úplně objasněna. Předpokládá se jejich možné zapojení při stavech úzkosti (Toufexis et al. 2004; Schumacher et al. 2007; Auger et al. 2008), při vzniku růstového kužele a neuroprotektu (Davare et al. 2009). PS inhibuje aktivitu TRPC5 v závislosti na jeho koncentraci, zatímco jeho nesulfatovaná forma nemá žádné účinky. Kanál je inhibován také PA-S i jeho nesulfatovanou formou. Velice slabým inhibátorem je DHEAS. Látka nejvíce potěně inhibovat tento receptor je ženský pohlavní hormon progesteron (Majeed et al. 2011).

Steroid	Účinky na TRPC5	Reference
PS	inhibice	(Majeed et al. 2011)
PA-S	inhibice	(Majeed et al. 2011)
DHEA-S	slabá inhibice	(Majeed et al. 2011)

Tabulka 6: Účinky sulfatovaných neurosteroidů na TRPC5 kanál

Je zajímavé, že steroidy testované na receptory TRPV1, TRPM3 a TRPC5 se liší ve svých účincích. V případě receptoru TRPV1 jsou publikované informace o jeho aktivaci, ale zároveň i inhibici (Tabulka 4). Oproti tomu práce věnující se vlivu steroidních látek na TRPM3 receptor nachází pouze steroidy s účinky potenciačními nebo žádnými (Tabulka 5). Žádný z testovaných steroidů nebyl schopen stimulovat TRPC5 (Tabulka 6). Tentýž steroid může mít odlišné účinky při aplikaci na různé kanály z rodiny TRP. Jisté je, že na těchto kanálech existuje vazebné místo pro steroidy. Dalším závěrem je fakt, že i malá změna v stereoizomerii steroidu vede k odlišné efektivitě.

Strukturní komponenty látek zodpovědné za jejich účinky byly vysloveny pouze pro TRPM3 kanál. Konkrétně sulfátová skupina v pozici *cis* kruhu, dvojná vazba v kruhu B, acetylová skupina v kruhu D a steroidní kostra stojí za potenciačními účinky na tomto kanálu (Majeed et al. 2010).

## 4 Metabotropní receptory

### 4.1 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na sigma 1 receptor

Sigma receptory jsou receptory v savčím mozku, krom toho se však vyskytují i v periferních orgánech. Tento receptor byl dříve označen jako jeden z členů rodiny opioidních receptorů (Gilbert et al. 1976). Později se ukázalo, že agonisté sigma receptorů jsou odlišné látky od opiátů, a proto byly vymezeny jako samostatná skupina receptorů. Na základě studií struktury a aktivity byly rozděleny do dvou tříd-  $\sigma_1$  a  $\sigma_2$  (Quirion et al. 1992). Sigma receptory mohou být funkčně spojeny s G proteiny, společně s tím mají úlohu v regulaci intracelulárního vápníku, čímž ovlivňují presynaptickou funkci. Existuje spojení NMDA receptorů s receptory sigma. Selektivní ligandy pro sigma receptory modulují aktivitu NMDA receptorů. Steroidní látky jsou schopné se vázat přímo na sigma receptor (Richard Bergeron et al. 1993; R. Bergeron et al. 1996; Bermack et al. 2005; Martina et al. 2007). Tyto receptory mají funkci při regulaci nálad, paměti, kognice a zřejmě mají vliv i na synaptickou plasticitu (Hayashi et al. 2004).

PS má schopnost inhibovat sigma receptory (Su et al. 1988). Získaná zjištění jsou v souladu s dříve zmíněnými poznatky o inhibičním účinku PS na NMDA receptory. Pregnenolon sulfát zřejmě působí na receptory třemi mechanismy. Buď přímo na NMDA receptor, což má za následek potenciaci nebo dochází k inhibici, ta je ale přímá, kdy PS se váže na M3-M4 smyčku GluN2 (Horak et al. 2006). Třetí možností je dochází k nepřímé inhibici, zřejmě mediována skrze sigma receptory (Monnet et al. 1995).

Obecně je působení na sigma receptory agonistou následováno mobilizací intracelulárních zásob vápníku, za kterou stojí IP<sub>3</sub> receptory. K té může docházet postsynapticky nebo presynapticky. V případě postsynaptického působení po vazbě ligandu na sigma receptor dochází k potenciaci NMDAR, zabránění otevření vápníkem ovládaných draselných kanálů a na základě toho je zvýšen influx vápníku (Martina et al. 2007). Dále uvedené pokusy se věnují presynaptickým účinkům sigma receptorů.

Vliv PS na sigma receptor byl dále zkoumán, konkrétně jeho vliv na miniaturní excitační postsynaptické proudy, jinak řečeno odpovědi na spontánní výlevy presynaptických váčků. Pokud má modulátor vliv na presynaptický výlev neurotransmiteru, mění frekvenci těchto

proudů a nikoli amplitudu. PS zvyšuje frekvenci proudů a to indikuje jeho schopnost zvyšovat pravděpodobnost výlevu glutamátu z presynaptického terminálu (Meyer et al. 2002).

Tento efekt je zřejmě způsoben aktivací sigma 1 receptorů spojených s G proteiny a schopných zvyšovat intracelulární hladiny vápníku, neboť při použití PTX (inhibitor G proteinů) byl efekt PS na miniaturní excitační posynaptické proudy snížen. Zároveň je chelátor vápníku BAPTA-AM schopen blokovat účinek PS na výlev, což indikuje zvýšené intracelulární množství vápenatých kationtů způsobené PS (Meyer et al. 2002).

Při dalším zkoumání tohoto jevu bylo zjištěno, že PS zvyšuje pravděpodobnost výlevu glutamátu v závislosti na věku zvířete (Meyer et al. 2002; Mameli et al. 2005). V hipokampálních řezech zvířat starých 3-5 dní je efekt zvýšené koncentrace intracelulárního vápníku způsobený presynaptickými NMDAR, poté následuje zpožděná potenciace postsynaptických AMPAR. U zvířat starších než P6 tento efekt mizí (Mameli et al. 2005).

V rámci zkoumání presynaptického účinku PS v dospělých hipokampálních neuronech bylo prokázáno, že PS zvyšuje krátkodobou potenciaci skrze mechanismus spojený s G proteiny prostřednictvím vazby k sigma receptoru. Tato vazba ale nemá efekt na bazální glutamátový výlev (Schiess et al. 2005).

Účinek DHEA-S, který byl zmiňován v kapitole o NMDA receptorech, a jeho vliv na LTP, je zřejmě rovněž důsledkem zapojení sigma receptorů. Při hledání, skrze jaký mechanismus dochází při chronickém podání DHEA-S k zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů, přímý účinek DHEA-S na NMDAR není příliš pravděpodobný. Naopak z výše zmiňovaných poznatků je zásadní, že spojení těchto receptorů s receptory sigma možné je, což bylo také potvrzeno. Konkrétní mechanismus účinku je prozatím velice spekulativní (L. Chen, Miyamoto, et al. 2006).

## **4.2 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na metabotropní glutamátový receptor**

Metabotropní glutamátové receptory (mGluRs) jsou receptory spřažené s G proteiny a jejich agonistou je glutamát. Z názvu těchto receptorů je patrné, že se nejedná o iontové kanály, nýbrž o receptory, které po vazbě ligandu spouští signální kaskády (Pin et al. 1995).

Existuje pouze jedna práce zabývající se vlivem sulfatovaných neurosteroidů na tento typ neurotransmise. Konkrétně se jedná o práci věnující se vlivu a mechanismu dehydroepiandrosteron sulfátu na mGlu. Tento neurosteroid je schopen indukovat STP – krátkodobou potenciaci. Za vyvolanou indukci jsou zodpovědné pravděpodobně metabotropní glutamátové receptory a následná aktivace signální kaskády. Specificky jde o kaskádu mGlu-PLC-RyR-PKC-ERK. Zajímavé je, že celý proces je nezávislý na aktivaci inositoltrisfosfátových receptorů. Pro potvrzení, zda stojí za účinkem mGlu, byl použit agonista těchto receptorů, který vyvolal stejnou signální kaskádu jako DHEA-S (Xu et al. 2012).

### **4.3 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na vápníkové kanály**

Vápníkové kanály se dají dělit různými způsoby. Obecně se ale dají rozdělit na dvě velké skupiny. První jsou napětově řízené vápníkové kanály rozvětřující se dále na ty, které se aktivují vysokým, středním nebo nízkým napětím. Druhou skupinou jsou kanály ovládané ligandem (Zhorov et al. 2004).

Pregnenolon sulfát je inhibitorem vysokonapětových vápníkových kanálů v CA1 hipokampálních neuronech. Steroid se váže na extracelulární stranu membrány a jeho účinek je v uvedeném případě nepřímý. Účinek je závislý na koncentraci PS a napětí. Pravděpodobně se jedná o mechanismus spojený s G proteiny a aktivací PKC citlivého na působení PTX (Pertussis toxin). Při substituci sulfátové skupiny za acetátovou steroid ztratil veškerou aktivitu na tomto typu kanálů (Ffrench-Mullen et al. 1994).

Receptory sigma jsou funkčně spojeny s NMDAR. Účinek PS na sigma receptor může být přímý, anebo nepřímý. Při vazbě agonisty na receptor dochází k mobilizaci intracelulárních zásob vápníku – pre nebo postsynapticky. PS může zvyšovat pravděpodobnost výlevu glutamátu, která je proměnná s věkem. Účinek DHEA-S na NMDAR je zřejmě také důsledkem zapojení sigma receptorů.

Problém účinku sulfatovaných neurosteroidů na metabotropní receptory je ten, že není vždy jasné, zda působí steroid na metabotropní receptor, anebo se jedná o nepřímý účinek. Další problém je ne zcela objasněné spojení sigma receptorů s NMDAR. Tato kapitola je jako jediná ponechána bez souhrnné tabulky, neboť účinek jmenovaných látek není jednoznačný a bylo by potřeba více dat k zřetelnému posouzení o přímém účinku neurosteroidu.

## 5 Kanály

### 5.1 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na draslíkové kanály

Draslíkové kanály jsou významné pro procesy nervové dráždivosti a sekreci solí, hormonů, transmitterů. Zároveň se podílí na udržování elektrochemického gradientu v buňce. Dělí se do čtyř skupin. První skupinou jsou vápníkem aktivované draslíkové receptory, které se otevírají po navázání  $\text{Ca}^{2+}$  popř. jiné signální molekuly. Druhým typem jsou tzv. inwardly rectifying kanály (Kir) zodpovědné za přenos draslíku do nitra buňky. Třetím typem jsou tandem pore domain kanály, které jsou téměř neustále otevřené a podílí se na udržování negativního membránového potenciálu. Posledním typem jsou napětím řízené draslíkové kanály, které se otevírají popř. zavírají při změně transmembránového napětí (Sansom et al. 2002).

#### 5.1.1 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na kanály Kir

Kanál Kir2.3 patří do skupiny inwardly rectifying draslíkových kanálů, nacházejících se v prosencephalonu. Modulace těchto kanálů je důležitá, neboť se předpokládá jejich zapojení při mnoha patologických stavech. Konkrétně jsou významné pro kognici, paměť, emoce a neuropsychiatrická onemocnění (Kobayashi et al. 2009).

Na tento kanál bylo testováno hned několik neurosteroidů. Pregnenolon sulfát má schopnost reverzibilní potenciace Kir2.3 závislé na koncentraci použitého PS. Zároveň je vazba PS řízena pravděpodobně z extracelulární strany plazmatické membrány a není závislá na změnách pH. Pregnanolon tento efekt nevykazuje (Kobayashi et al. 2009).

DHEA-S měl velice malé až žádné potenciační účinky na Kir2.3. Při koaplikaci PS a DHEA-S nebyl zjištěn antagonistický vztah při vazbě na tento kanál. DHEA nemá na tento kanál žádný účinek (Kobayashi et al. 2009).

Další kanály z rodiny inwardly rectifying draslíkových kanálů nevykazovaly na působení PS odpovědi. Konkrétně byly testovány kanály Kir1.1, Kir2.1, Kir2.2 a Kir3.1/Kir3.2 (Kobayashi et al. 2009).

Steroid	Účinky na Kir kanály	Reference
<b>Pregnenolon sulfát</b>	potenciace	(Kobayashi et al. 2009)
<b>DHEA-S</b>	mírná potenciace/bez účinku	(Kobayashi et al. 2009)

Tabulka 7: Účinky sulfatovaných neurosteroidů na Kir kanál

### 5.1.2 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na napětím řízené draslíkové kanály

Napětím řízené draslíkové kanály se podílejí na vzniku akčního potenciálu a tím pádem mají schopnost modulovat další napětím řízené kanály např. sodné nebo vápenaté. Dále ovlivňují výlev neurotransmiterů a podílí se na regulaci vnitrobuněčného vápníku (Boireau et al. 1991; Schechter 1997).

Účinky neurosteroidních látek byly testovány i na napětově řízené draslíkové kanály, konkrétně Kv1.1 a Kv2.1. Byl testován vliv PS, 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-on sulfát (5 $\alpha$ 3 $\alpha$ S) a 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-on sulfát. Aktivační kinetika pro kanál Kv1.1 jmenovaných neurosteroidů byla napětově závislá:  $\tau_a$  se snižuje se zvyšující se membránovou depolarizací. Pregnenolon sulfát redukuje aktivační časovou konstantu  $\tau_a$ . Při vyšších koncentracích (100  $\mu$ M) byl jeho účinek inhibiční. Redukuje  $\tau_a$  Kv.2.1 v závislosti na jeho množství. 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-on sulfát (5 $\alpha$ 3 $\alpha$ S) 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one sulfát (5 $\beta$ 3 $\alpha$ S) jsou schopny signifikantně zvýšit  $\tau_a$  Kv.1.1 pouze ve vysokých koncentracích 100  $\mu$ M. Žádný z těchto steroidů nemá vliv na  $\tau_a$  Kv.2.1 (Wang et al. 1998).

Všechny testované steroidy byly schopné zvyšovat  $\tau_d$  – deaktivací časovou konstantu kanálu Kv1.1, nikoli Kv2.1. Dále snižovaly aktivační prahový potenciál a zpomalovaly deaktivací časový průběh (Wang et al. 1998).

Steroid	Účinky na Kv kanály	Reference
<b>Pregnenolon sulfát</b>	inhibuje $K_v$ 1.1 a 2.1, zvysuje $\tau_d$ $K_v$ 1.1 redukuje $\tau_a$ $K_v$ 2.1	(Wang et al. 1998)
<b>Allopregnanolon sulfát (5<math>\alpha</math>3<math>\alpha</math>S)</b>	zvysuje $\tau_a$ $K_v$ 1.1 zvysuje $\tau_d$ $K_v$ 1.1	(Wang et al. 1998)
<b>Epiandrosteron sulfát (5<math>\beta</math>3<math>\alpha</math>S)</b>	zvysuje $\tau_a$ $K_v$ 1.1 zvysuje $\tau_d$ $K_v$ 1.1	(Wang et al. 1998)

Tabulka 8: Účinky sulfatovaných neurosteroidů na Kv kanál

## 5.2 Vliv sulfatovaných neurosteroidů na sodné kanály

Sodné kanály jsou proteiny lokalizované v plazmatické membráně propouštějící ionty sodíku. Tyto kanály mohou být řízeny napětím nebo ligandem. Mají úlohu v iniciaci akčního potenciálu a šíření signálu ve vzrušivých tkáních (Horishita et al. 2012). Bylo zjištěno, že mají současně roli i v excitotoxicitě, a proto jsou hledány účinné blokátory těchto kanálů, které mají neuroprotektivní účinky (Carter et al. 2000). Předpokládá se, že právě alfa podjednotky sodných kanálů by se mohly stát cílem pro analgetika na zánětlivou a neuropatickou bolest (Black et al. 1999, 2004).

V této studii byl zkoumán vliv PS na alfa podjednotku  $Na_v1.2$  sodných kanálů, ta je exprimována v CNS. PS měl schopnost inhibovat funkci tohoto kanálu. Inhibice je napětově závislá. Nesulfatovaný derivát pregnenolon nevykazoval žádný účinek (Horishita et al. 2012).

DHEA-S i DHEA jsou také inhibičními neurosteroidy, ale mnohem méně potentní než pregnenolonu sulfát (Horishita et al. 2012).

Dále byl testován vliv PA-S a allopregnanolon sulfátu na několik typů alfa podjednotek sodných kanálů. Konkrétně  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.6$ ,  $Na_v1.7$  a  $Na_v1.8$ . Oba testované steroidy vykazovaly napětově a use-dependentní inhibici sodných kanálů. Nejvíce potentní inhibice byla pozorována na  $Na_v1.2$  kanálech allopregnanolon sulfátem (Horishita et al. 2014).



Steroid	Účinky na Nav kanály	Reference
<b>Pregnenolon sulfát</b>	inhibice	(Horishita et al. 2012)
<b>DHEA-S</b>	inhibice	(Horishita et al. 2012)
<b>PA-S</b>	Inhibice	(Horishita et al. 2014)
<b>Allopregnanolon sulfát (5<math>\alpha</math>3<math>\alpha</math>S)</b>	inhibice	(Horishita et al. 2014)

Tabulka 9: Účinky sulfatovaných neurosteroidů na Nav kanál

Draselné kanály je možné potencovat i inhibovat sulfatovanými neurosteroidy. Inwardly rectifying draselné kanály je možné potencovat (Tabulka 7). Nicméně většina testovaných Kir kanálů nevykazuje žádné odpovědi na působení PS. V případě napětově řízených draslíkových kanálů Kv je možné pozorovat účinek PS na oba testované kanály Kv1.1 i Kv2.1. Allopregnanolon sulfát i epiandrosteron sulfát mají schopnost zvyšovat  $\tau_a$  i  $\tau_d$  Kv1.1, na Kv 2.1 nemají vliv (Tabulka 8).

Na alfa podjednotku sodných kanálů byly testovány čtyři různé steroidní látky a všechny vykazovaly inhibiční účinky (Tabulka 9). Charakteristická je také napěťová závislost inhibice.

## 6 Závěr

Tato práce shrnuje poznatky o účincích sulfatovaných neurosteroidů na proteiny účastnící se excitačního synaptického přenosu. Sulfatované neurosteroidy mají vliv i na inhibiční synaptický přenos, jak již bylo zmíněno v úvodu. Z výše jmenovaných účinků steroidních látek je evidentní, že mají schopnost modulovat synaptický přenos. Jejich vazba je, na rozdíl od ostatních steroidů, rychlá a přímá. Nadměrná nebo naopak nedostatečná aktivita receptorů nebo kanálů může být důsledkem patologických stavů. Právě kvůli mnoha stavům spojeným s poruchami regulace výše jmenovaných receptorů je nezbytné hledat látky, které mají schopnost pozitivně nebo negativně modulovat synaptický přenos. Neurosteroidní látky mají potenciál ve farmakologickém užití pro různé typy disfunkcí.

Otázkou zůstává, jaké strukturní komponenty steroidu stojí za jeho inhibičním/potenciačním účinkem. Malý strukturní rozdíl může způsobit odlišný efekt v působení. Vzhledem ke specifitě těchto vazeb není možné deklarovat žádné univerzální pravidlo. Většinou je ale možné ustanovit pravidlo pro daný receptor, nicméně i jiné podjednotkové složení receptoru může znamenat odlišné účinky. Při syntéze analogů neurosteroidních látek se využívá právě strukturních znalostí neurosteroidů a je snaha vyvíjet látky s poupravenou strukturou, a tím docílit, aby byla jejich účinnost co největší. Právě strukturní požadavky neurosteroidů a jejich vliv na synaptický přenos jsou důležitou otázkou farmakologie.

Další nezodpovězenou otázkou je mechanismus účinku těchto látek. Jak je patrné z některých kapitol, pouze u malého množství těchto látek a receptorů/kanálů je znám konkrétní mechanismus účinku. Právě tato znalost by mohla být dalším vodítkem pro farmakologické studie.

Existují i další práce věnující se vlivu pozorovaných látek na synaptický přenos, ale ve velkém množství případů je informací známo velice málo a jsou zmiňovány spíše okrajově, a proto nejsou součástí práce. Problémem je zároveň nedostatek recentních studií na toto téma.

Cílem další experimentální práce by mělo být hledání strukturních determinant těchto látek, které jsou zodpovědné za jejich působení a zároveň snaha objasnit mechanismus účinku, skrze který k modulaci dochází.

## 7 Seznam použité literatury

- Aizenman, E., S.A. Lipton, and R.H. Loring. 1989. "Selective Modulation of NMDA Responses by Reduction and Oxidation." *Neuron* 2 (3): 1257–63.
- Aronica, E., D.W. Dickson, Y. Kress, J.H. Morrison, and R.S. Zukin. 1997. "Non-Plaques Dystrophic Dendrites in Alzheimer Hippocampus: A New Pathological Structure Revealed by Glutamate Receptor Immunocytochemistry." *Neuroscience* 82 (4): 979–91.
- Auger, C.J., and R.M. Forbes-Lorman. 2008. "Progesterone Receptor-Mediated Reduction of Anxiety-Like Behavior in Male Rats." Edited by Paul A. Bartell. *PLoS ONE* 3 (11): e3606.
- Beaujean, D., J. Do-Rego, L. Galas, A.G. Mensah-Nyagan, R. Fredriksson, D. Larhammar, A. Fournier, V. Luu-The, G. Pelletier, and H. Vaudry. 2002. "Neuropeptide Y Inhibits the Biosynthesis of Sulfated Neurosteroids in the Hypothalamus through Activation of Y(1) Receptors." *Endocrinology* 143 (5): 1950–63.
- Bergeron, R., C. De Montigny, and G. Debonnel. 1996. "Potentiation of Neuronal NMDA Response Induced by Dehydroepiandrosterone and Its Suppression by Progesterone: Effects Mediated via Sigma Receptors." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (3): 1193–1202.
- Bergeron, Richard, Guy Debonnel, and Claude De Montigny. 1993. "Modification of the N-Methyl-D-Aspartate Response by Antidepressant  $\sigma$  Receptor Ligands." *European Journal of Pharmacology* 240 (2–3): 319–23.
- Bermack, J.E., and G. Debonnel. 2005. "Distinct Modulatory Roles of Sigma Receptor Subtypes on Glutamatergic Responses in the Dorsal Hippocampus." *Synapse (New York, N.Y.)* 55 (1): 37–44.
- Black, J.A., T.R. Cummins, C. Plumpton, Y.H. Chen, W. Hormuzdiar, J.J. Clare, and S.G. Waxman. 1999. "Upregulation of a Silent Sodium Channel after Peripheral, but Not Central, Nerve Injury in DRG Neurons." *Journal of Neurophysiology* 82 (5): 2776–85.
- Black, J.A., S. Liu, M. Tanaka, T.R. Cummins, and S.G. Waxman. 2004. "Changes in the Expression of Tetrodotoxin-Sensitive Sodium Channels within Dorsal Root Ganglia Neurons in Inflammatory Pain." *Pain* 108 (3): 237–47.
- Boireau, A., F. Richard, V. Olivier, M. Aubeneau, J.M. Miquet, P. Dubédat, P. Laduron, A. Doble, and J.C. Blanchard. 1991. "Differential Effects of Potassium Channel Blockers on Dopamine Release from Rat Striatal Slices." *The Journal of Pharmacology and Pharmacology* 43 (11): 798–801.
- Borovska, J., V. Vyklicky, E. Stastna, V. Kapras, B. Slavikova, M. Horak, H. Chodounska, and L. Vyklicky Jr. 2012. "Access of Inhibitory Neurosteroids to the NMDA Receptor." *British Journal of Pharmacology* 166 (3): 1069–83.
- Cameron, K., E. Bartle, R. Roark, D. Fanelli, M. Pham, B. Pollard, B. Borkowski, et al. 2012. "Neurosteroid Binding to the Amino Terminal and Glutamate Binding Domains of Ionotropic Glutamate Receptors." *Steroids* 77 (7). Elsevier Inc.: 774–79.
- Carter, A.J., M. Grauert, U. Pschor, W.D. Bechtel, C. Bartmann-Lindholm, Y. Qu, T. Scheuer, W.A. Catterall, and T. Weiser. 2000. "Potent Blockade of Sodium Channels

- and Protection of Brain Tissue from Ischemia by BIII 890 CL.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (9): 4944–49.
- Caterina, M.J., A. Leffler, A.B. Malmberg, W.J. Martin, J. Trafton, K.R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A.I. Basbaum, and D. Julius. 2000. “Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor.” *Science (New York, N.Y.)* 288 (5464): 306–13.
- Compagnone, N.A., E. Salido, L.J. Shapiro, and S.H. Mellon. 1997. “Expression of Steroid Sulfatase during Embryogenesis.” *Endocrinology* 138 (11): 4768–73.
- Corpechot, C., Robel, P., Axelson, M., Sjoval, J., and E. E. Baulieu. 1981. “Characterization and Measurement of Dehydroepiandrosterone Sulfate in Rat Brain.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78 (8): 4704–7.
- Corpéhot, C., M. Synguelakis, S. Talha, M. Axelson, J. Sjövall, R. Vihko, E.E. Baulieu, and P. Robel. 1983. “Pregnenolone and Its Sulfate Ester in the Rat Brain.” *Brain Research* 270 (1): 119–25.
- Davare, M.A., D.A. Fortin, T. Saneyoshi, S. Nygaard, S. Kaeck, G. Banker, T.R. Soderling, and G.A. Wayman. 2009. “Transient Receptor Potential Canonical 5 Channels Activate Ca<sup>2+</sup>/calmodulin Kinase IIγ to Promote Axon Formation in Hippocampal Neurons.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (31): 9794–9808.
- Davis, J.B., J. Gray, M.J. Gunthorpe, J.P. Hatcher, P.T. Davey, P. Overend, M.H. Harries, et al. 2000. “Vanilloid Receptor-1 Is Essential for Inflammatory Thermal Hyperalgesia.” *Nature* 405 (6783): 183–87.
- Dingledine, R., S.F.F. Traynelis, K. Borges, D. Bowie, and S.F.F. Traynelis. 1999. “The Glutamate Receptor Ion Channels.” *Pharmacological Reviews* 51 (1): 7–61.\*
- Donevan, S.D., and M.A. Rogawski. 1993. “GYKI 52466, a 2,3-Benzodiazepine, Is a Highly Selective, Noncompetitive Antagonist of AMPA/kainate Receptor Responses.” *Neuron* 10 (1): 51–59.
- Ffrench-Mullen, J.M., P. Danks, and K.T. Spence. 1994. “Neurosteroids Modulate Calcium Currents in Hippocampal CA1 Neurons via a Pertussis Toxin-Sensitive G-Protein-Coupled Mechanism.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 14 (4): 1963–77.
- Gilbert, P.E., and W.R. Martin. 1976. “The Effects of Morphine and Nalorphine-like Drugs in the Nondependent, Morphine-Dependent and Cyclazocine-Dependent Chronic Spinal Dog.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 198 (1): 66–82.
- Greger, I.H., E.B. Ziff, and A.C. Penn. 2007. “Molecular Determinants of AMPA Receptor Subunit Assembly.” *Trends in Neurosciences* 30 (8): 407–16.\*
- Grimm, Ch., R. Kraft, S. Sauerbruch, G. Schultz, and Ch. Harteneck. 2003. “Molecular and Functional Characterization of the Melastatin-Related Cation Channel TRPM3.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (24): 21493–501.
- Hayashi, T., and T. Su. 2004. “Sigma-1 Receptor Ligands: Potential in the Treatment of Neuropsychiatric Disorders.” *CNS Drugs* 18 (5): 269–84.\*
- Higashi, T., Y. Daifu, and K. Shimada. 2001. “Studies on Neurosteroids XIV. Levels of

- Dehydroepiandrosterone Sulfate in Rat Brain and Serum Determined with Newly Developed Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.” *Steroids* 66 (12): 865–74.
- Hoffmann, A., Ch. Grimm, R. Kraft, O. Goldbaum, A. Wrede, Ch. Nolte, U. Hanisch, et al. 2010. “TRPM3 Is Expressed in Sphingosine-Responsive Myelinating Oligodendrocytes.” *Journal of Neurochemistry* 114 (3): 654–65.
- Horak, M., K. Vlcek, H. Chodounska, and L. Vyklicky. 2006. “Subtype-Dependence of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Modulation by Pregnenolone Sulfate.” *Neuroscience* 137 (1): 93–102.
- Horak, M., K. Vlcek, M. Petrovic, H. Chodounska, and L. Vyklicky. 2004. “Molecular Mechanism of Pregnenolone Sulfate Action at NR1/NR2B Receptors.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (46): 10318–25.
- Horishita, T., S. Ueno, N. Yanagihara, Y. Sudo, Y. Uezono, D. Okura, and T. Sata. 2012. “Inhibition by Pregnenolone Sulphate, a Metabolite of the Neurosteroid Pregnenolone, of Voltage-Gated Sodium Channels Expressed in *Xenopus* Oocytes.” *Journal of Pharmacological Sciences* 120 (1): 54–58.
- Horishita, T., N. Yanagihara, S. Ueno, Y. Sudo, Y. Uezono, D. Okura, T. Minami, T. Kawasaki, and T. Sata. 2014. “Neurosteroids Allopregnanolone Sulfate and Pregnanolone Sulfate Have Diverse Effect on the  $\alpha$  Subunit of the Neuronal Voltage-Gated Sodium Channels Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7, and Nav1.8 Expressed in *Xenopus* Oocytes.” *Anesthesiology* 121 (3): 620–31.
- Huettner, J.E., and B.P. Bean. 1988. “Block of N-Methyl-D-Aspartate-Activated Current by the Anticonvulsant MK-801: Selective Binding to Open Channels.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (4): 1307–11.
- Huganir, R.L., and R.A. Nicoll. 2013. “AMPA Receptors and Synaptic Plasticity: The Last 25 Years.” *Neuron* 80 (3): 704–17.\*
- Chalmers, D.T., D. Dewar, D.I. Graham, D.N. Brooks, and J. McCulloch. 1990. “Differential Alterations of Cortical Glutamatergic Binding Sites in Senile Dementia of the Alzheimer Type.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (4): 1352–56.
- Chang, P.K.Y., D. Verbich, and R.A. McKinney. 2012. “AMPA Receptors as Drug Targets in Neurological Disease - Advantages, Caveats, and Future Outlook.” *European Journal of Neuroscience* 35 (12): 1908–16.\*
- Chen, L., X. Dai, and M. Sokabe. 2006. “Chronic Administration of Dehydroepiandrosterone Sulfate (DHEAS) Primes for Facilitated Induction of Long-Term Potentiation via Sigma 1 ( $\sigma$ 1) Receptor: Optical Imaging Study in Rat Hippocampal Slices.” *Neuropharmacology* 50 (3): 380–92.
- Chen, L., Y. Miyamoto, K. Furuya, X. Dai, N. Mori, and M. Sokabe. 2006. “Chronic DHEAS Administration Facilitates Hippocampal Long-Term Potentiation via an Amplification of Src-Dependent NMDA Receptor Signaling.” *Neuropharmacology* 51 (3): 659–70.
- Chen, S., and F. Wu. 2004. “Mechanism Underlying Inhibition of the Capsaicin Receptor-Mediated Current by Pregnenolone Sulfate in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons.” *Brain Research* 1027 (1–2): 196–200.
- Choi, D.W. 1987. “Ionic Dependence of Glutamate Neurotoxicity.” *The Journal of*

- Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 7 (2): 369–79.
- Irwin, R.P., S.Z. Lin, M.A. Rogawski, R.H. Purdy, and S.M. Paul. 1994. “Steroid Potentiation and Inhibition of N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Mediated Intracellular Ca<sup>++</sup> Responses: Structure-Activity Studies.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 271 (2): 677–82.
- Jang, M.K., D.F. Mierke, S.J. Russek, and D.H. Farb. 2004. “A Steroid Modulatory Domain on NR2B Controls N-Methyl-D-Aspartate Receptor Proton Sensitivity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (21): 8198–8203.
- Jung, J., S.W. Hwang, J. Kwak, S.Y. Lee, C.J. Kang, W.B. Kim, D. Kim, and U. Oh. 1999. “Capsaicin Binds to the Intracellular Domain of the Capsaicin-Activated Ion Channel.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (2): 529–38.
- Kawata, M., M. Nishi, K. Matsuda, H. Sakamoto, N. Kaku, M. Masugi-Tokita, K. Fujikawa, Y. Hirahara-Wada, K. Takanami, and H. Mori. 2008. “Steroid Receptor Signalling in the Brain--Lessons Learned from Molecular Imaging.” *Journal of Neuroendocrinology* 20 (6): 673–76.
- Kobayashi, T., K. Washiyama, and K. Ikeda. 2009. “Pregnenolone Sulfate Potentiates the Inwardly Rectifying K<sup>+</sup> Channel Kir2.3.” Edited by Michael N. Nitabach. *PLoS ONE* 4 (7): e6311.
- Lanthier, A., and V.V. Patwardhan. 1986. “Sex Steroids and 5-En-3 Beta-Hydroxysteroids in Specific Regions of the Human Brain and Cranial Nerves.” *Journal of Steroid Biochemistry* 25 (3): 445–49.
- Lee, N., J. Chen, L. Sun, S. Wu, K.R. Gray, A. Rich, M. Huang, et al. 2003. “Expression and Characterization of Human Transient Receptor Potential Melastatin 3 (hTRPM3).” *Journal of Biological Chemistry* 278 (23): 20890–97.
- Lerma, J., A. Paternain, A. Rodríguez-Moreno, and J. López-García. 2001. “Molecular Physiology of Kainate Receptors.” *Physiological Reviews* 81 (3): 971–98.\*
- Lipton, S.A. 1993. “Prospects for Clinically Tolerated NMDA Antagonists: Open-Channel Blockers and Alternative Redox States of Nitric Oxide.” *Trends in Neurosciences* 16 (12): 527–32.\*
- Lynch, M.A. 2004. “Long-Term Potentiation and Memory.” *Physiological Reviews* 84 (1): 87–136.\*
- Majeed, Y., A.K. Agarwal, J. Naylor, V.L. Seymour, S. Jiang, K. Muraki, C.G. Fishwick, and D.J. Beech. 2010. “Cis-Isomerism and Other Chemical Requirements of Steroidal Agonists and Partial Agonists Acting at TRPM3 Channels.” *British Journal of Pharmacology* 161 (2): 430–41.
- Majeed, Y., M.S. Amer, A.K. Agarwal, L. McKeown, K.E. Porter, D.J. O’Regan, J. Naylor, C.G. Fishwick, K. Muraki, and D.J. Beech. 2011. “Stereo-Selective Inhibition of Transient Receptor Potential TRPC5 Cation Channels by Neuroactive Steroids.” *British Journal of Pharmacology* 162 (7): 1509–20.
- Majewska, M.D., and R.D. Schwartz. 1987. “Pregnenolone-Sulfate: An Endogenous Antagonist of the Gamma-Aminobutyric Acid Receptor Complex in Brain?” *Brain Research* 404 (1–2): 355–60.

- Malayev, A., T.T. Gibbs, and D.H. Farb. 2002. "Inhibition of the NMDA Response by Pregnenolone Sulphate Reveals Subtype Selective Modulation of NMDA Receptors by Sulphated Steroids." *British Journal of Pharmacology* 135 (4): 901–9.
- Mameli, M., M. Carta, Partridge L.D., and Valenzuela C.F. 2005. "Neurosteroid-Induced Plasticity of Immature Synapses via Retrograde Modulation of Presynaptic NMDA Receptors." *Journal of Neuroscience* 25 (9): 2285–94.
- Manahan-Vaughan, D., D. von Haebler, Ch. Winter, G. Juckel, and U. Heinemann. 2008. "A Single Application of MK801 Causes Symptoms of Acute Psychosis, Deficits in Spatial Memory, and Impairment of Synaptic Plasticity in Rats." *Hippocampus* 18 (2): 125–34.
- Martina, M., M.B. Turcotte, S. Halman, and R. Bergeron. 2007. "The Sigma-1 Receptor Modulates NMDA Receptor Synaptic Transmission and Plasticity via SK Channels in Rat Hippocampus." *The Journal of Physiology* 578 (1): 143–57.
- Mathur, C., V.V. Prasad, V.S. Raju, M. Welch, and S. Lieberman. 1993. "Steroids and Their Conjugates in the Mammalian Brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (1): 85–88.
- Mayer, M.L. 2005. "Glutamate Receptor Ion Channels." *Current Opinion in Neurobiology* 15 (3): 282–88.\*
- McIlhinney, R.A.J., E. Molnár, J.R. Atack, and P.J. Whiting. 1996. "Cell Surface Expression of the Human N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit 1a Requires the Co-Expression of the NR2A Subunit in Transfected Cells." *Neuroscience* 70 (4): 989–97.
- Meyer, D.A., M. Carta, L.D. Partridge, D.F. Covey, and C.F. Valenzuela. 2002. "Neurosteroids Enhance Spontaneous Glutamate Release in Hippocampal Neurons. Possible Role of Metabotropic sigma1-like Receptors." *Journal of Biological Chemistry* 277 (32): 28725–32.
- Miller, B., M. Sarantis, S.F. Traynelis, and D. Attwell. 1992. "Potentiation of NMDA Receptor Currents by Arachidonic Acid." *Nature* 355 (6362): 722–25.
- Monnet, F.P., V. Mahé, P. Robel, and E.E. Baulieu. 1995. "Neurosteroids, via Sigma Receptors, Modulate the [3H]norepinephrine Release Evoked by N-Methyl-D-Aspartate in the Rat Hippocampus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (9): 3774–78.
- Mortaud, S., E. Donsez-Darcel, P.L. Roubertoux, and H. Degrelle. 1996. "Murine Steroid Sulfatase Gene Expression in the Brain during Postnatal Development and Adulthood." *Neuroscience Letters* 215 (3): 145–48.
- Oberwinkler, J., and S.E. Phillipp. 2007. "TRPM3." Journal Article, Review. *Handbook of Experimental Pharmacology*, no. 179: 253–67.\*
- Olney, J.W. 1969. "Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate." *Science (New York, N.Y.)* 164 (3880): 719–21.
- Palecek, J., V. Neugebauer, S.M. Carlton, S. Iyengar, and W.D. Willis. 2004. "The Effect of a Kainate GluR5 Receptor Antagonist on Responses of Spinothalamic Tract Neurons in a Model of Peripheral Neuropathy in Primates." *Pain* 111 (1): 151–61.
- Park-Chung, M., F.S. Wu, and D.H. Farb. 1994. "3 Alpha-Hydroxy-5 Beta-Pregnan-20-One Sulfate: A Negative Modulator of the NMDA-Induced Current in Cultured Neurons."

- Molecular Pharmacology* 46 (1): 146–50.
- Park-Chung, M., F.S. Wu, R.H. Purdy, A.A. Malayev, T.T. Gibbs, and D.H. Farb. 1997. “Distinct Sites for Inverse Modulation of N-Methyl-D-Aspartate Receptors by Sulfated Steroids.” *Molecular Pharmacology* 52: 1113–23.
- Parsons, M.P., and L.A. Raymond. 2014. “Extrasynaptic NMDA Receptor Involvement in Central Nervous System Disorders.” *Neuron* 82 (2): 279–93.\*
- Petrovic, M., M. Sedlacek, M. Horak, H. Chodounska, and L. Vyklický. 2005. “20-Oxo-5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ -Yl Sulfate Is a Use-Dependent NMDA Receptor Inhibitor.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (37): 8439–50.
- Pin, J.P., and R. Duvoisin. 1995. “The Metabotropic Glutamate Receptors: Structure and Functions.” *Neuropharmacology* 34 (1): 1–26.\*
- Quirion, R., W.D. Bowen, Y. Itzhak, J.L. Junien, J.M. Musacchio, R.B. Rothman, T.P. Su, S.W. Tam, and D.P. Taylor. 1992. “A Proposal for the Classification of Sigma Binding Sites.” *Trends in Pharmacological Sciences* 13 (3): 85–86.
- Ramsey, I. S., M. Delling, and D.E. Clapham. 2006. “An Introduction to TRP Channels.” *Annual Review of Physiology* 68 (1): 619–47.\*
- Rogawski, M.A., and G.L. Wenk. 2006. “The Neuropharmacological Basis for the Use of Memantine in the Treatment of Alzheimer’s Disease.” *CNS Drug Reviews* 9 (3): 275–308.\*
- Rogawski, Michael A. 1993. “Therapeutic Potential of Excitatory Amino Acid Antagonists: Channel Blockers and 2,3-Benzodiazepines.” *Trends in Pharmacological Sciences* 14 (9): 325–31.\*
- Rubinsztein, D.C., J. Leggo, M. Chiano, A. Dodge, G. Norbury, E. Rosser, and D. Craufurd. 1997. “Genotypes at the GluR6 Kainate Receptor Locus Are Associated with Variation in the Age of Onset of Huntington Disease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (8): 3872–76.
- Sansom, M.S.P., I.H. Shrivastava, J.N. Bright, J. Tate, Ch.E. Capener, and P.C. Biggin. 2002. “Potassium Channels: Structures, Models, Simulations.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1565 (2): 294–307.\*
- Shimada, M., K. Yoshinari, E. Tanabe, E. Shimakawa, M. Kobashi, K. Nagata, and Y. Yamazoe. 2001. “Identification of ST2A1 as a Rat Brain Neurosteroid Sulfotransferase mRNA.” *Brain Research* 920 (1–2): 222–25.
- Schechter, L.E. 1997. “The Potassium Channel Blockers 4-Aminopyridine and Tetraethylammonium Increase the Spontaneous Basal Release of [3H]5-Hydroxytryptamine in Rat Hippocampal Slices.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 282 (1): 262–70.
- Schiess, A.R., and L.D. Partridge. 2005. “Pregnenolone Sulfate Acts through a G-Protein-Coupled  $\sigma$ 1-like Receptor to Enhance Short Term Facilitation in Adult Hippocampal Neurons.” *European Journal of Pharmacology* 518 (1): 22–29.
- Schumacher, M., R. Guennoun, A. Ghoumari, Ch. Massaad, F. Robert, M. El-Etr, Y. Akwa, K. Rajkowski, and E. Baulieu. 2007. “Novel Perspectives for Progesterone in Hormone



- Replacement Therapy, with Special Reference to the Nervous System.” *Endocrine Reviews* 28 (4): 387–439.\*
- Simmons, R.M.A, D.L. Li, KH. Hoo, M. Deverill, P.L. Ornstein, and S. Iyengar. 1998. “Kainate GluR5 Receptor Subtype Mediates the Nociceptive Response to Formalin in the Rat.” *Neuropharmacology* 37 (1): 25–36.
- Slavikova, Barbora, Hana Chodounska, Michaela Nekardova, Vojtech Vyklicky, Marek Ladislav, Pavla Hubalkova, Barbora Krausova, Ladislav Vyklicky, and Eva Kudova. 2016. “Neurosteroid-like Inhibitors of *N*-Methyl- D -Aspartate Receptor: Substituted 2-Sulfates and 2-Hemisuccinates of Perhydrophenanthrene.” *Journal of Medicinal Chemistry* 59 (10): 4724–39.
- Smolders, I., Z.A. Bortolotto, V.R.J Clarke, R. Warre, G.M. Khan, M.J. O’Neill, P.L. Ornstein, et al. 2002. “Antagonists of GLUK5-Containing Kainate Receptors Prevent Pilocarpine-Induced Limbic Seizures.” *Nature Neuroscience* 5 (8): 796–804.
- Spivak, V., A. Lin, P. Beebe, L. Stoll, and L. Gentile. 2004. “Identification of a Neurosteroid Binding Site Contained within the GluR2-S1S2 Domain.” *Lipids* 39 (8): 811–19.
- Sprosen, T.S., and G.N. Woodruff. 1990. “Polyamines Potentiate NMDA Induced Whole-Cell Currents in Cultured Striatal Neurons.” *European Journal of Pharmacology* 179 (3): 477–78.
- Su, T., E. London, and J. Jaffe. 1988. “Steroid Binding at Sigma Receptors Suggests a Link between Endocrine, Nervous, and Immune Systems.” *Science* 240 (4849): 219–21.
- Toufexis, D.J., C. Davis, A. Hammond, and M. Davis. 2004. “Progesterone Attenuates Corticotropin-Releasing Factor-Enhanced but Not Fear-Potentiated Startle via the Activity of Its Neuroactive Metabolite, Allopregnanolone.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (45): 10280–87.
- Traynelis, S.F., L.P. Wollmuth, C.J. McBain, F.S. Menniti, K.M. Vance, K. K. Ogden, K.B. Hansen, H. Yuan, S.J. Myers, and R. Dingledine. 2010. “Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function.” *Pharmacological Reviews* 62 (3): 405–96.\*
- Traynelis, Stephen F, Lonnie P Wollmuth, Chris J Mcbain, Frank S Menniti, Katie M Vance, Kevin K Ogden, Kasper B Hansen, Hongjie Yuan, Scott J Myers, and Ray Dingledine. 2010. “Glutamate Receptor Ion Channels : Structure , Regulation , and Function.” *Journal of Neuroscience* 62 (3): 405–96.\*
- Vyklicky, V., T. Smejkalova, B. Krausova, A. Balik, M. Korinek, J. Borovska, M. Horak, et al. 2016. “Preferential Inhibition of Tonically over Phasically Activated NMDA Receptors by Pregnane Derivatives.” *Journal of Neuroscience* 36 (7): 2161–75.
- Wagner, T.F.J., S. Loch, S. Lambert, I. Straub, S. Mannebach, I. Mathar, M. Düfer, et al. 2008. “Transient Receptor Potential M3 Channels Are Ionotropic Steroid Receptors in Pancreatic  $\beta$  Cells.” *Nature Cell Biology* 10 (12): 1421–30.
- Wagster, M.V., J.C. Hedreen, C.E. Peyser, S.E. Folstein, and Ch.A. Ross. 1994. “Selective Loss of [3H]Kainic Acid and [3H]AMPA Binding in Layer VI of Frontal Cortex in Huntington’s Disease.” *Experimental Neurology* 127 (1): 70–75.
- Wang, Q., L. Wang, and J. Wardwell-Swanson. 1998. “Modulation of Cloned Human Neuronal Voltage-Gated Potassium Channels (hKv1.1 and hKv2.1) by Neurosteroids.”

*Pflügers Archiv* 437 (1): 49.

- Weaver, C.E., M.B. Land, R.H. Purdy, K.G. Richards, T.T. Gibbs, and D.H. Farb. 2000. "Geometry and Charge Determine Pharmacological Effects of Steroids on N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Induced Ca(2+) Accumulation and Cell Death." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 293 (3): 747–54.
- Wong, M., and R.L. Moss. 1994. "Patch-Clamp Analysis of Direct Steroidal Modulation of Glutamate Receptor-Channels." *Journal of Neuroendocrinology* 6 (3): 347–55.
- Wu, F., and S. Chen. 1997. "Mechanism Underlying the Effect of Pregnenolone Sulfate on the Kainate-Induced Current in Cultured Chick Spinal Cord Neurons." *Neuroscience Letters* 222 (2): 79–82.
- Wu, F.S., T.T. Gibbs, and D.H. Farb. 1991. "Pregnenolone Sulfate: A Positive Allosteric Modulator at the N-Methyl-D-Aspartate Receptor." *Molecular Pharmacology* 40 (3): 333–36.
- Xu, Y., M. Tanaka, L. Chen, and M. Sokabe. 2012. "DHEAS Induces Short-Term Potentiation via the Activation of a Metabotropic Glutamate Receptor in the Rat Hippocampus." *Hippocampus* 22 (4): 707–22.
- Yaghoubi, N., A. Malayev, S.J. Russek, T.T. Gibbs, and D.H. Farb. 1998. "Neurosteroid Modulation of Recombinant Ionotropic Glutamate Receptors." *Brain Research* 803 (1–2): 153–60.
- Zamudio-Bulcock, P.A., J. Everett, Ch. Harteneck, and C.F. Valenzuela. 2011. "Activation of Steroid-Sensitive TRPM3 Channels Potentiates Glutamatergic Transmission at Cerebellar Purkinje Neurons from Developing Rats." *Journal of Neurochemistry* 119 (3): 474–85.
- Zamudio-Bulcock, P.A., and C.F. Valenzuela. 2011. "Pregnenolone Sulfate Increases Glutamate Release at Neonatal Climbing Fiber-to-Purkinje Cell Synapses." *Neuroscience* 175. Elsevier Inc.: 24–36.
- Zhorov, B.S., and D.B. Tikhonov. 2004. "Potassium, Sodium, Calcium and Glutamate-Gated Channels: Pore Architecture and Ligand Action." *Journal of Neurochemistry* 88 (4): 782–99.\*